

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-194

(43) 公開日 平成7年(1995)1月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/00	B	9282-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平5-143242	(71) 出願人	000231637 日本製粉株式会社 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目27番5号
(22) 出願日	平成5年(1993)6月15日	(72) 発明者	関口 哲 東京都世田谷区桜丘5-47-20 桜丘リー ダースマンション502
		(72) 発明者	船山 綾子 神奈川県横浜市瀬谷区橋戸1-31-1 橋 戸原ハイツ9-401
		(72) 発明者	久保田 肇 神奈川県藤沢市辻堂東海岸1-13-17
		(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無細胞タンパク合成系によるタンパクの製造方法

(57) 【要約】

【構成】 無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの製造方法において、フォスファターゼ阻害剤又はグルタチオン合成酵素阻害剤の存在下にタンパク合成を行うことを特徴とする方法。

【効果】 従来の約2倍の効率でタンパクを合成することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの製造方法において、フォスファターゼ阻害剤又はグルタチオン合成酵素阻害剤の存在下にタンパク合成を行うことを特徴とする方法。

【請求項2】 無細胞抽出液が小麦胚芽抽出液である請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの製造方法に関する。ここで無細胞タンパク合成系とは、mRNAの情報を読み取ってタンパクやポリペプチドを合成する無細胞翻訳系、並びにDNAを鋳型としてRNAを合成する無細胞転写系と無細胞翻訳系の両者を含む系のいずれをも意味するものとする。

【0002】

【従来の技術】無細胞タンパク合成系を用いたタンパクやポリペプチドの製造方法として、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、大腸菌等の抽出液を用いる方法が知られている。しかしながら、それらの抽出液を用いて、量的に十分なタンパクを合成することは難しく、タンパクの合成量を増加させる為の種々の工夫がなされてきた。その一つとして、特開平1-50311号公報には、mRNA、ATP、GTP及びアミノ酸を基質として含んでいるリボソームの無細胞例えばタンパク合成系において、最終生産物であるAMP、GDP、ピロリン酸塩、無機リン酸及び合成されたポリペプチドを含んでいる翻訳生産物を反応系から取り出し、それと同時にアミノ酸、ATP及びGTPの形態の基質を、それらの初期濃度を維持するために反応系へ送り出すポリペプチドの製造方法が記載されている。この方法によれば、従来1時間程度でポリペプチドの合成が停止してしまうものが、40時間以上に渡って反応が継続し、合成されるポリペプチドの収量も大きく増加することが示されている。また、この改良法として、特開平4-200390号公報には、基質の送液系や反応系中の気相の介在を最小限に制御することにより、反応槽内の圧力の変動を減らして基質の送液を安定化して、ポリペプチドを合成する方法が記載されている。更に、反応系より反応生成物を取り出す限外濾過膜を反応系の側面もしくは上面に置くことにより、下面に置くのに比べて改良が図られることも併せて記載されている。しかしながら、これらの方法は、高価な機器と厳密な送液条件を必要とし、また、連続的に送り込まれる基質が、タンパク合成反応に十分に利用されずに排出されてしまうという問題もあった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、上記の従来技術の問題点を解決し、安定かつ簡便に十分な量のタンパクを合成させることのできる、無細胞

2

タンパク合成系を用いたタンパクの製造方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】前記の目的を達成するために、本発明者らは鋭意研究を重ね、無細胞タンパク合成系のATP等の基質エネルギーが、タンパク合成反応以外で消費されることを抑制することにより、タンパク合成反応の効率を高くすることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。本発明は、無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの製造方法において、フォスファターゼ阻害剤又はグルタチオン合成酵素阻害剤の存在下にタンパク合成を行うことを特徴とする方法である。本発明方法では、基質エネルギーの殆どがタンパク合成に有効に利用され、タンパク合成以外の反応により消費されることが抑制されるため、タンパクの合成量を顕著に高くすることができる。本発明に使用する無細胞抽出液としては、例えば、小麦胚芽抽出液及び大腸菌細胞抽出液等が挙げられる。この明細書において、タンパク合成活性は、合成された酵素タンパクの酵素量(1unit:1分間に1 μ molの基質を変化させる酵素量)で表す。

【0005】以下、本発明に使用する無細胞抽出液の調製から無細胞タンパク合成系におけるタンパク合成活性の測定までの各段階について詳細に説明する。

1) 無細胞抽出液の調製と抽出液の濃縮

無細胞抽出液の調製は、用いる材料に応じて異なるが、通常のいかなる方法を用いても良い。特に小麦胚芽を用いる場合は、臭化メチル処理されていない原料小麦の胚芽を用いる事が望ましい。

ii) 無細胞タンパク合成反応

続いて、タンパク合成反応を実施するが、合成反応は、バッチ法、連続法等通常のいかなる方法を用いても良い。反応液には、無細胞抽出液の他、目的とするタンパクの構成アミノ酸、目的とするタンパクをコードするDNA、RNA、RNAポリメラーゼ、緩衝剤、ATP、GTP等のエネルギー源、クレアチンホスフェート、クレアチンホスホキナーゼ、フォスフォエノールピルビン酸、ピルビン酸キナーゼ等のATP再生系、DTT(ジチオスレイトール)、スベルミジン、スベルミン等の安定化剤、RNase阻害剤等を適量加える。ATP、GTP等の基質エネルギー物質、特にATPの濃度は0.1~3.0mMが適当であり、1mMが最も好ましい。反応は、用いる無細胞抽出液及び目的とするタンパクの種類等により最適の温度で行なわれ、一般に20~40℃が適当である。

【0006】本発明者らの研究により、従来の反応系を充分に解析した結果以下の現象が明らかとなった。無細胞抽出液中には、フォスファターゼ等の脱リン酸酵素や、グルタチオン合成酵素等のATPを利用する酵素が存在する。これらの酵素は、タンパク合成反応に競合し

て基質エネルギーを分解したり消費したりする。この反応はきわめて活性が高く、基質エネルギーを大量に消費するため、目的のタンパク合成反応が十分に進行しない。この対策として、タンパク合成反応液中の基質エネルギー物質の濃度を高める方法が考えられる。しかし、無細胞タンパク合成の反応系において基質エネルギー物質には至適濃度があり、この至適濃度より高くすると、逆に基質エネルギー物質の活性が大きく阻害されることが知られており、有効な方法ではない。そこで、タンパク合成反応に競合して基質エネルギーを消費する酵素を阻害する事が有効ではないかと考えさらに研究を進めた。その結果、フォスファターゼの阻害剤、若しくはグルタチオン合成酵素の阻害剤を反応系に添加し、これらの阻害剤の存在下に反応を行うことにより、基質エネルギーがタンパク合成反応に有効に利用され、タンパク合成活性を高めることが確認された。このように本発明においてタンパク合成活性が高くなる主な理由は、反応系中の基質エネルギーが、目的とするタンパク合成に有効に利用され、競合する他の反応には利用されにくくなるためであると考えられる。

【0007】本発明に使用されるフォスファターゼ阻害剤の例としては、グリコール酸、グリセリン酸等の α -ヒドロキシカルボン酸、又はフォスファターゼに対する抗体が挙げられる。中でもグリコール酸が、価格や簡便性の面から望ましい。またグルタチオン合成酵素阻害剤の例としては、グルタチオン(GSH)やグルタチオン合成酵素に対する抗体等が挙げられる。中でもグルタチオンが、価格や簡便性の面から望ましい。フォスファターゼに対する抗体やグルタチオン合成酵素に対する抗体は、通常の方法により、適当な動物をフォスファターゼ又はグルタチオン合成酵素により免疫することにより製造されたものを使用することができる。本発明において無細胞タンパク合成系に添加されるフォスファターゼ阻害剤の量は、通常2~70mM、好ましくは5~30mMである。またグルタチオン合成酵素阻害剤の量は、通常2~50mM、好ましくは5~20mMである。フォスファターゼ阻害剤又はグルタチオン合成酵素阻害剤の量が上記範囲以外では目的とするタンパク合成活性の向上が十分でない。

【0008】以下、比較例及び実施例によって本発明を具体的に説明する。

【実施例1及び比較例1】

小麦胚芽抽出液の調製

K. MarucとB. Dudockの方法(Nucleic Acids Research 1巻, 11号, 1385-1397項, 1974年)に従って小麦胚芽抽出液の調製を行なった。この際、抽出液並びに抽出液の精製に用いるゲル濾過の緩衝液に、10%程度のグリセリンを添加してもよい。

無細胞タンパク合成反応

比較例1の反応液は、60 mM HEPES buffer (KOHにてpH7.6に調節)、1mM ATP、100 μ M GTP、2 mM DTT、12mMクレアチンリン酸、40 μ g/ml クレアチンホスホキナーゼ、0.1 mM スペルミジン、0.01 mM スペルミン、160 μ Mアミノ酸、1.0 U/ μ l RNase 阻害剤、11 ng/ μ l DHFR (ジヒドロフォレートレダクターゼ)、RNA、83 mM K^+ 、2.8 mM Mg^{++} 、小麦胚芽抽出液5 μ lの組成からなり、全量を15 μ lとした。ただし、 K^+ 、 Mg^{++} の濃度は、小麦胚芽抽出液からの持込みも合せた値で表した。反応は30℃で1時間行なった。実施例1の反応液は、上記比較例1の反応液中にグリコール酸を最終濃度10 mM になるように添加したものを使用した。

タンパク合成活性の測定

反応終了後の反応液より5.5 μ lをとり、次の反応条件にてDHFRの活性を測定した。50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)、500 μ Mジヒドロフォレート、60 μ M β -NADPH、12 mM 2-メルカプトエタノール。37℃において反応液中の340nmの吸光度の減少を測定した。下記表1に結果を示す。

【0009】

【実施例2及び比較例2】反応液中にグリコール酸を最終濃度20 mM になるように添加した他は実施例1及び比較例1と同様の方法により行なった。表1に結果を示す。

【実施例3及び比較例3】反応液中にグルタチオン(GSH)を最終濃度10mMになるように添加した他は実施例1及び比較例1と同様の方法により行なった。表1に結果を示す。

【実施例4及び比較例4】反応液中にグルタチオン(GSH)を最終濃度20mMになるように添加した他は実施例1及び比較例1と同様の方法により行なった。表1に結果を示す。

【0010】

【表1】

	反応液中の無細胞抽出液の タンパク合成活性 (m units/ml)	倍率 (比較例を1とする)
比較例1	253	1
実施例1	434	1.7
比較例2	373	1
実施例2	755	2.0
比較例3	253	1
実施例3	624	2.5

5

6

比較例4

332

1

実施例4

681

2.1

【0011】

【発明の効果】本発明の方法で無細胞タンパク合成反応

を実施すると、従来の約2倍の効率でタンパクを合成することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 山根 恒夫

愛知県名古屋市千種区若水3丁目22-1

(72)発明者 中野 秀雄

愛知県岩倉市東新町下境52 岩倉団地51棟
403号室